AUS DER UNIVERSITÄTSKLINIK UND POLIKLINIK
FÜR HALS-, NASEN- UND OHRENKRANKE WÜRZBURG
Direktor: Prof. Dr. Walter KLEY

MORPHOLOGISCHE UND HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN FRÜHVERÄNDERUNGEN WÄHREND DER KARZINOGENESE DER ZYMBALDRÜSE DER RATTE, INDUZIERT DURCH TRANS-4-DIMETHYLAMINOSTILBEN

Inaugural-Dissertation
verfaßt und der Hohen Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Fritz Werner
aus Bayreuth

Würzburg, den 29.10.1979

1980

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

AUS DER UNIVERSITÄTSKLINIK UND POLIKLINIK
FÜR HALS-, NASEN- UND OHRENKRANKE WÜRZBURG

Direktor: Prof. Dr. Walter KLEY

MORPHOLOGISCHE UND HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN FRÜHVERÄNDERUNGEN WÄHREND DER KARZINOGENESE DER ZYMBALDRÜSE DER RATTE, INDUZIERT DURCH TRANS-4-DIMETHYLAMINOSTILBEN

Inaugural-Dissertation
verfaßt und der Hohen Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Fritz Werner
aus Bayreuth

Würzburg, den 29.10.1979

Referent:	Priv.-Doz. Dr. J. F. HERRMANN
Korreferent:	Prof. Dr. W. KLEY
Dekan:	Prof. Dr. K.-H. WULF

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Meiner Mutter gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543521_0012

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 5

II. MATERIAL UND METHODIK 7

III. ERGEBNISSE 11

a) Anatomie und Topographie der Zymbaldrüse der Ratte 11

b) das normale Enzymmuster der Zymbaldrüse 12

c) das Enzymmuster der praeneoplastischen Veränderungen 16

ca) die direkte Karzinogenese 16

cb) die Hyperplasio-Karzinogenese 20

d) Statistik 25

IV. DISKUSSION 30

a) der histochemischen Befunde 30

b) der morphologischen Befunde 34

V. ZUSAMMENFASSUNG 38

VI. LITERATURVERZEICHNIS 41

I. EINLEITUNG

Bei der chemisch induzierten Karzinogenese müssen zwei Wirkungsmechanismen unterschieden werden.

Bei der direkten Wirkung vermag das applizierte Karzinogen (zum Beispiel Teer) selbst lokal Tumoren zu erzeugen. Andere Substanzen erreichen erst durch Metabolisierung im Organismus die wirksame Form, das "ultimale Karzinogen". Die Mehrzahl der Karzinogene, die am Gehörgang bzw. an der Zymbaldrüse Tumoren induzieren, gehört der Gruppe der aromatischen Amine an. Dazu zählt auch das in dieser Untersuchung verwendete trans-4-Dimethylaminostilben (t-4-DAS).
J. A. MILLER und E. C. MILLER (1969) nahmen an, daß aromatische Amine erst als N-Hydroxy-Derivate bzw. deren Ester karzinogen wirksam seien.

Nach H. G. NEUMANN und Mitarb. (1973) erfolgt die Aktivierung von trans-4-DAS zum ultimalen Karzinogen in der Rattenleber.

M. METZLER und H. G. NEUMANN (1971) untersuchten den Stoffwechsel von trans-4-DAS und den nicht-karzinogenen Derivaten cis-4-Dimethylaminostilben und 4-Dimethylaminobibenzyl. Dabei ergab sich, daß alle drei Substanzen auf identischen Stoffwechselwegen metabolisiert werden. Nur der prozentuale Anteil einzelner Stoffwechselwege und die Ausscheidungsmuster differierten. Die unterschiedliche karzinogene Wirksamkeit läßt sich damit nur schwer deuten.

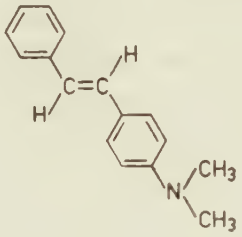
Im Gegensatz zum hochwirksamen trans-4-DAS besitzt die cis-Verbindung, wie H. G. NEUMANN und Mitarb. (1970) zeigten, nur geringe karzinogene Aktivität. NEUMANN führte dies auf eine Hemmung der Reaktionsfähigkeit der funktionellen Aminogruppen durch den aromatischen Rest zurück.

Ungeklärt ist die Frage nach der Ursache für die Organspezifität von trans-4-DAS. Nach radioaktiver Markierung dieser Substanz zeigten H. K. RJOSK und H. G. NEUMANN (1971), daß im Bereich des Gehörganges bzw. seiner Anhangsgebilde keine Speicherung des Karzinogens erfolgt. So dürfte die Ursache für die neoplastische Transformation nicht in einer Anreicherung des Karzinogens in den Zellen des Zielorgans liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, an kanzerisiertem Gewebe unabhängig vom Wirkungsmechanismus die Art der Veränderungen und den Zeitpunkt ihres Auftretens zu untersuchen. Abweichungen im Stoffwechsel und in der Gestalt der Zellen sollten dabei als erste faßbare Indizien für die in Gang befindliche Transformation beschrieben werden.

II. MATERIAL UND METHODIK

Die Untersuchungen wurden an 3oo männlichen Wistar-Ratten durchgeführt, die anfangs durchschnittlich 200 g wogen. Als Karzinogen diente trans-4-Dimethylaminostilben (Fa. Schuchardt, Praep. Nr. DI 7786), das spektrophotometrisch auf Reinheit geprüft wurde. Die Untersuchung ergab, daß die verwendete Substanz annähernd 100 % trans-4-DAS enthielt.



trans-4-Dimethylaminostilben

Die Tiere erhielten das Karzinogen, eingebacken in Futterteig, in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht/Tag vom ersten bis zum 170. Versuchstag, also bis zu einer maximalen Gesamtdosis von 170 mg/kg Körpergewicht, dazu Trinkwasser ad libitum.

Der Futterteig wurde nach Angaben von H. DRUCKREY und Mitarb. (1962) hergestellt.

Nach Absetzen des Karzinogens wurde Altromin-Standardkost verfüttert.

Die Tierhaltung erfolgte frei von pathogenen Keimen im klimatisierten Tierstall bei 20 - 22°C in Makrolonkäfigen. Vom 120. bis zum 413.

Tag nach Beginn der Kanzerisierung wurden pro Arbeitstag 1-3 Tiere getötet und untersucht. Die Tötung durch Nackenschlag erfolgte konstant um 7 Uhr morgens, um mögliche Tageszeit-abhängige Schwankungen im Enzymmuster auszuschließen. Danach wurden beide Gehörgänge mit den Zymbaldrüsen abpräpariert.

Von einem retroaurikulären Schnitt aus wurde der knorpelige Gehörgang freigelegt, am Übergang in den knöchernen Anteil durchtrennt und gemeinsam mit der an der ventralen Gehörgangswand gelegenen Zymbaldrüse entnommen. In die Gehörgänge wurden kleine Muskelstükke eingeführt, um das Ablösen des Epithels beim Schneiden zu vermeiden. Die so vorbereiteten Organe wurden aufgeblockt, mit Kohlensäureschnee tiefgefroren und im Kryostaten zu Serienschnitten von 4 µ Dicke verarbeitet. Dabei wurden von jedem Block in 9 Stufen jeweils 9 kontinuierlich aufeinander folgende Schnitte - von jedem Tier also 81 - angefertigt. Die histochemische Untersuchung der in der folgenden Tabelle aufgeführten Enzyme wurde an den unfixierten Kryostatschnitten durchgeführt. Die Nachweismethoden und die im weiteren benutzten Abkürzungen sind dort angegeben. (Tabelle 1, s. S. 9)

Für die morphologischen Untersuchungen und zur Identifizierung enzymhistochemisch auffälliger Bezirke wurden Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte jeweils vom Beginn und Ende jeder Stufe angefertigt. Außerdem erfolgte Glykogen-Nachweis (Gly) durch Fixierung nach P. NEUKIRCH (1909) und Färbung nach F. BEST (1906).

Die Enzymbestimmung variierte von Stufe zu Stufe nach dem in Tabelle 2 (s. S. 10) dargestellten Schema. Die arabischen Ziffern geben die laufende Schnittnummer an.

TABELLE 1

Enzyme	Methode
Oxidoreduktasen	
Nikotinamidadenindinucleotid--H-Diaphorase (NADH)	SKARPELLI, HESS u. PEARSE, 1958
Laktatdehydrogenase (LDH)	GRZYCKI u. RZESZOWSKA, 1967
Succinatdehydrogenase (SDH)	ROSA u. TSOU, 1961
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PD)	RUDOLPH u. KLEIN, 1964
Cytochromoxidase (CytOx)	NACHLAS et al., 1958
Hydrolasen	
1. Phosphatasen	
Alkalische Phosphatase (aPh)	STUTTE, 1967
Saure Phosphatase (sPh)	GÖSSNER, 1958
Adenosintriphosphatase (ATPase)	WACHSTEIN u. MEISEL, 1957
2. Esterasen	
5-Bromindoxylacetatesterase (5-BI)	HOLT u. WITHERS, 1952
α-Naphthylacetatesterase (α-NE)	SELIGMAN u. Mitarb., 1949
3. Glykosidasen	
ß-Glucuronidase (ß-Gluc)	RATH u. OTTO, 1966

TABELLE 2

I.	V.	IX.		II.	VI.		III.	VII.		IV.	VIII.	Stufe
1	37	73	HE	10	46	HE	19	55	HE	28	64	HE
2	38	74	aPh	11	47	ß-Gluc	20	56	α-NE, SDH	29	65	aPh
3	39	75	5-BI	12	48	aPh	21	57	LDH	30	66	Gly
4	40	76	LDH	13	49	ATPase	22	58	aPh	31	67	NADH
5	41	77	Gly	14	50	CytOx	23	59	Gly	32	68	5-BI
6	42	78	aPh	15	51	5-BI	24	60	G-6-PD	33	69	LDH
7	43	79	NADH	16	52	NADH	25	61	5-BI	34	70	aPh
8	44	80	5-BI	17	53	aPh	26	62	aPh	35	71	G-6-PD
9	45	81	HE	18	54	HE	27	63	HE	36	72	HE

III. ERGEBNISSE

a) ANATOMIE UND TOPOGRAPHIE DER ZYMBALDRÜSE DER RATTE

Die Zymbaldrüse der Ratte ist eine außerordentlich große Talgdrüse. Sie zeigt sich einer Präparation leicht zugänglich, ist von der Umgebung gut abzugrenzen und von homogener Konsistenz. Sie wurde deshalb für diese Untersuchungen ausgewählt.

W. E. ZYMBAL (1933) und C. ZAWISCH-OSSENITZ (1933) beschrieben erstmals diese Talgdrüse des Gehörgangs der Ratte. Sie liegt ventral des knorpeligen äußeren Gehörgangs an dessen Übergang in den knöchernen Anteil. Die Zymbaldrüse hat die Größe eines Stecknadelkopfes (3 - 4 mm) und ist von weißlich-gelber Farbe.

Es handelt sich um eine zusammengesetzte Drüse mit 3 bis 4 Lobi. Die Ausführungsgänge der einzelnen Läppchen verbinden sich zu einem Hauptausführungsgang, der in die ventrale Gehörgangswand mündet. Dieser Ausführungsgang ist wie der Gehörgang selbst mit zweischichtigem, gering verhornendem Plattenepithel ausgekleidet.

Ferner können im Gehörgang der Ratte kleine Talgdrüsen beobachtet werden, die entweder in einen Haarbalg oder direkt an der Oberfläche der Epidermis münden.

b) DAS NORMALE ENZYMMUSTER DER ZYMBALDRÜSE

Arbeiten von A. SCHAUER und E. KUNZE (1968), E. KUNZE und A. SCHAUER (1971), I. F. HERRMANN und A. SCHAUER (1972 und 1973) und I. F. HERRMANN und W. KAMKE (1974) hatten nach chemischer Kanzerisierung der Leber, Harnblase, Nasenschleimhaut und Zymbaldrüse der Ratte Veränderungen wie Enzymdefekte oder Neuauftreten von Enzymen ergeben.

Ziel dieser Arbeit war es, nach solchen Veränderungen der Enzymaktivitäten als den ersten praeneoplastischen Alterationen an der Zymbaldrüse zu suchen. Dies setzte die Bestimmung des charakteristischen Enzymmusters voraus, welches die Drüse auf Grund ihrer spezifischen Funktion besitzen muß.

Es ergab sich folgende Enzymverteilung:

NADH-Diaphorase und Laktatdehydrogenase zeigen im Bereich der azinoperipheren, generativen Zellen starke Aktivität. Die Granula des Reaktionsprodukts sind hier zu dichten Niederschlägen zusammengeflossen und annähernd gleichmäßig über Zytoplasma und Kern verteilt. Mit zunehmender Differenzierung der Zellen in zentroazinärer Richtung nimmt der Niederschlag ab. Im Bereich des Ausführungsganges (Ductulus), wo die äußeren Zellmembranen platzen und im Sinn der holokrinen Sekretion Zellreste und Talg abtransportiert werden, ist nur noch schwache Aktivität nachzuweisen. Die Granula finden sich hier nur im Zytoplasma. Der Niederschlag ist in Kernnähe verdichtet. Der Kern selbst scheint nahezu frei von Aktivität zu sein.

Die Succinatdehydrogenase besitzt im untersuchten Organ geringe Aktivität mit der gleichen, eben beschriebenen Abstufung nach zentroazinär. Die Formazankristalle als Endprodukte der Nachweisreaktion sind vorwiegend perinukleär verteilt. Einzelne Granula finden sich im Zytoplasma.

Cytochromoxidase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase ließen sich, insbesondere in den azinoperipheren Zellen der Drüse, als mittelstarker Niederschlag nachweisen. Die Granula sind diffus im Zytoplasma verteilt. Der Kern zeigt keine Reaktion.

Von den Hydrolasen ist die alkalische Phosphatase weder in der normalen Zymbaldrüse noch im Gehörgangsepithel nachzuweisen. Lediglich die Kapillaren in den bindegewebigen Septen der Drüse zeigen bekanntlich positive Reaktionsniederschläge.

Die Reaktion auf saure Phosphatase ergibt in den azinoperipher gelegenen Zellen nur sehr geringe Farbniederschläge. Das Zytoplasma der zentroazinären Zellen erscheint mäßig gefärbt. Der Kern zeigt keine Niederschläge. Lediglich im Bereich der äußeren Membranen der reifen Talgzellen läßt sich die sPh als intensiver Niederschlag nachweisen.

Die Adenosintriphosphatase ergibt im enzymhistochemischen Nachweis sehr dicht gelagerte Granula in den azinoperipheren Zellen mit ausgeprägter Abschwächung in Richtung des Ductulus. Der Niederschlag bedeckt in groben Körnern Zytoplasma und Kerne.

Die 5-Bromindoxylacetatesterase, Leitenzym der Talgdrüsen, besitzt hohe Aktivität im gesamten Zymbaldrüsenparenchym. Die Granula sind in den Zellen diffus über Zytoplasma und Kern verteilt.

Annähernd gleiche Befunde können beim Nachweis der α-Naphthylacetatesterase erhoben werden.

Die ß-Glucuronidase, eine Glykosidase, läßt sich als schwacher bis mittelstarker Niederschlag mit gleicher Verteilung über alle Talgdrüsenzellen nachweisen. Die feinen braunschwarzen Granula sind innerhalb der Zellen diffus über Zytoplasma und Kern verstreut.

Glykogen wird beim nicht kanzerisierten Tier weder in der Zymbaldrüse noch im Gehörgangsepithel gefunden.

Die Tabelle 3 (s. S. 15) gibt eine kurze Übersicht des normalen Enzymmusters der Zymbaldrüse.

Wesentlich ist der Hinweis, daß histochemische Enzymreaktionen zwar potentielle Stoffwechselleistungen anzeigen, aus der Stärke des Reaktionsausfalls aber keine quantitativen Schlüsse gezogen werden können (O. BRAUN-FALCO, 1961).

TABELLE 3

Enzym	Aktivität in der Zymbaldrüse
Oxydoreduktasen	
NADH-Diaphorase	+
Laktatdehydrogenase	+
Succinatdehydrogenase	(+)
Cytochromoxidase	+
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	+
Hydrolasen	
1. Phosphatasen	
alkalische Phosphatase	-
saure Phosphatase	(+)
Adenosintriphosphatase	+
2. Esterasen	
5-Bromindoxylacetatesterase	+
α-Naphthylacetatesterase	+
3. Glykosidasen	
ß-Glucuronidase	(+)
Glykogen	-

c) DAS ENZYMMUSTER DER PRAENEOPLASTISCHEN VERÄNDERUNGEN

Von 300 Tieren wurden insgesamt 24 300 Schnitte angefertigt und daran die enzymhistochemischen Nachweise vorgenommen. Auf Grund der Untersuchungen muß angenommen werden, daß zwei verschiedene Formen der Karzinogenese an diesem Modell existieren:

1. Die direkte Karzinogenese und
2. die Hyperplasio-Karzinogenese (bei der die Transformation mit der Entwicklung einer Hyperplasie einhergeht).

ca) Die direkte Karzinogenese

Bei der direkten Karzinogenese läuft die neoplastische Zelltransformation ohne die Entwicklung einer Hyperplasie ab. Dabei lassen sich verschiedene praeneoplastische Stadien unterscheiden.

Stadium I

Die erste histochemisch faßbare Veränderung der Zymbaldrüse war das Auftreten einer starken Aktivität der alkalischen Phosphatase in umschriebenen Bezirken. Beginnend an Einzelzellen wurde der Reaktionsniederschlag schließlich an Gruppen von Talgzellen und ganzen Azini beobachtet. Die Aktivität des Enzyms war zunächst nur im Bereich der äußeren Zellmembranen, dann im weiteren Verlauf der Transformation zunehmend im gesamten Zytoplasma nachzuweisen. Das Muster der anderen ge-

prüften Enzyme zeigte in diesem Stadium I keine Veränderungen. Die transformierenden Zellen (wie auch alle anderen) wiesen morphologisch keine Unterschiede zu normalen Talgzellen auf.

Stadium II a

In diesem Stadium konnte in identischen Bezirken eine starke Abschwächung der Aktivitäten der 5-Bromindoxylacetatesterase, Cytochromoxidase, α-Naphthylacetatesterase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase beobachtet werden. Die Aktivität der im ersten Stadium aufgetretenen alkalischen Phosphatase stieg in der oben beschriebenen Weise an. Der Niederschlag ließ sich, ausgehend von den äußeren Zellmembranen, zunehmend im Zytoplasma nachweisen.

Morphologische Veränderungen waren auch in diesem Stadium, abgesehen von einer gelegentlich beobachteten geringgradigen Basophilie, nicht mit Sicherheit festzustellen.

Stadium II b

Erstmals waren jetzt morphologische Veränderungen nachweisbar. Die Zellkerne der Stadium-II-b-Zellen zeigten Hyperchromasie und waren dichter gelagert, was vermutlich auf eine Differenzierungsstörung in Verbindung mit einer Steigerung der Proliferation zurückzuführen ist. Das Zytoplasma wurde optisch leer. Die Kern-Plasma-Relation war zugunsten des Kern verschoben. Die Zellen unterschieden sich deutlich von normalen Talgzellen.

Charakteristisch für dieses Stadium war der Ausfall der Laktatdehydrogenase und NADH-Diaphorase. Die Aktivität der alkali-

schen Phosphatase schien weiter zuzunehmen. Der Reaktionsniederschlag bedeckte jetzt gleichmäßig das gesamte Zytoplasma. Ob dies durch die Verkleinerung des zytoplasmatischen Raumes bei gleicher Aktivität der alkalischen Phosphatase oder durch eine tatsächliche Zunahme der alkalischen Phosphatase verursacht ist, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden. An den übrigen Enzymen bzw. Enzymdefekten änderte sich nichts.

Stadium III

Der Beginn des Stadiums III war durch das Auftreten einer deutlichen grobkörnigen Glykogenspeicherung im Zytoplasma der transformierenden Zellen gekennzeichnet. Während dieses Stadiums fiel die Aktivität der alkalischen Phosphatase wieder aus, an seinem Ende verschwand das Glykogen aus den Zellen. Die übrigen Enzymnachweise zeigten keine Veränderung. Die Zellkerne schienen noch dichter aneinanderzutreten.

Stadium IV

Auffälligste Befunde dieses Stadiums waren der Ausfall der alkalischen Phosphatase und das Verschwinden der Glykogenose. Gleichzeitig stiegen die Aktivitäten von Adenosintriphosphatase und Succinatdehydrogenase an.

Morphologisch ähnelten die Zellen den Basalzellen der Epidermis. Das Zytoplasma wurde zunehmend basophil ("basophile Herde"). Die Atypie der Zellkerne nahm zu.

Am Ende dieses Stadiums IV, des letzten enzymhistochemisch charakterisierbaren praeneoplastischen Stadiums, konnten zu-

nächst Carcinomata in situ mit ausgeprägten Zellatypien, Polymorphie, Hyperchromasie der Zellkerne und Verschiebung der Kern-Plasma-Relation beobachtet werden. Aus diesen Veränderungen entwickelten sich nach unterschiedlich langer Latenzzeit Mikrokarzinome mit infiltrierendem Wachstum.

Im Stadium IV wurden bisweilen in dem die praeneoplastischen Bezirke umgebenden Bindegewebe entzündliche Infiltrate aus Lymphozyten und Plasmazellen gefunden. Die Vermutung lag nahe, daß die praeneoplastische Veränderung der Zellen die Entzündung auslöste.

Zwei Beobachtungen stützten die Richtigkeit des dargelegten stadienhaften Verlaufs der Karzinogenese:

1. Regelmäßig traten Übergänge zu den Nachfolgestadien auf.
2. Im Ablauf der Untersuchungen folgten die Stadien zeitlich aufeinander.

Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß I. F. HERRMANN in früheren Arbeiten (1974), in denen er Untersuchungen am gleichen Kanzerisierungsmodell durchführte, eine abweichende Einteilung der Stadien vornahm. Die ältere Nomenklatur sah die Stadien I, II, III, III-IV und IV vor. Die hier vorgelegte überarbeitete Einteilung faßt das zweite Stadium (Stadium II a), welches enzymhistochemisch klar definiert, aber kurz und schwer faßbar ist, mit dem dritten Stadium (Stadium II b) zusammen. Das vierte Stadium (Stadium III), früher als Übergangsstadium III-IV bezeichnet, erhält den Rang eines eigenen Stadiums, da es von längerer Dauer und leichter faßbar ist.

Die folgende Tabelle 4 erläutert die Veränderungen der Enzymaktivitäten in den einzelnen Stadien.

TABELLE 4

Enzym	0	I	II a	II b	III	IV
aPh	-	+	++	+++	+++	-
5-BI	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
α-NE	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
CytOx	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
G-6-PD	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
NADH	+	+	+	-	-	-
LDH	+	+	+	-	-	-
ATPase	+	+	+	+	+	++
SDH	+	+	+	+	+	++
Gly	-	-	-	-	+	-

Zeichenerklärung:

	+	Aktivität vorhanden
bzw.	++ +++	gesteigerte Aktivität
	(+)	stark reduzierte Aktivität
	-	keine Aktivität nachweisbar

cb) Die Hyperplasio-Karzinogenese

Grundsätzlich können Hyperplasien entweder durch gesteigerte Proliferation des generativen Zell-Pools oder durch verlangsamte Differenzie-

rung der Zellen entstehen. Zwischen mitotischer Aktivität und Zellreifungsgeschwindigkeit besteht ein Fließgleichgewicht (steady state). Bezogen auf das Modell der Zymbaldrüse setzt die Bildung von Hyperplasien nach unseren Beobachtungen durch vermehrte mitotische Aktivität der in der Peripherie der Läppchen gelegenen Basalzellen ein.

Das Karzinogen erwies sich bei diesem Weg der Tumorentstehung als doppelt wirksam: Neben der karzinogenen besaß es auch hyperplasiogene Wirkung.

Die Hyperplasio-Karzinogenese zeigte denselben stadienhaften Ablauf wie die direkte Karzinogenese. Eine Hyperplasie ohne histochemisch manifestierte Transformation konnte niemals beobachtet werden. Es lag daher die Vermutzung nahe, daß sich die Hyperplasie aus dem Stadium I entwickelt oder daß sie gleichzeitig mit ihm entsteht.

Es traten verschiedene Varianten der Hyperplasie auf:

Die einfache Hyperplasie Stadium 0-I

Ein mäßig vergrößerter Drüsenazinus wies im Bereich einiger oder aller Zellen zarte Reaktionsniederschläge der alkalischen Phosphatase an den äußeren Membranen auf.

Morphologische Zellveränderungen waren nicht festzustellen.

Die einfache Hyperplasie Stadium I - II b

In ausgeprägt hyperplastischen Drüsenazini wurden Zellgruppen verschiedener Stadien (I - II b) gefunden. Die Ursache liegt da-

rin, daß das Stadium II a von kürzerer Dauer ist als die Zeitspanne des physiologischen Zellabstroms, in der die Drüsenzellen sich von der Basalzellschicht lösen und in den Ausführungsgang gelangen. Während der Wanderung der Stadium-I-Zellen nach zentroazinär transformieren die peripheren generativen Zellen über das ultrakurze Stadium II a (möglicherweise nur ein Zellzyklus Dauer) ins Stadium II b.

Die einfache Hyperplasie mit zeitlich verzögerter Basalzelltransformat (I - IV)

Einige Hyperplasien zeigten eine senkrecht zur Basalmembran angeordnete Streifung, die durch den Wechsel von positiven und negativen Enzymreaktionen hervorgerufen wurde. Man kann annehmen, daß in diesen Fällen die generativen Zellen gruppenweise mit zeitlicher Verzögerung transformieren und das jeweilige Stadium bei der Zellteilung an die azinozentral abwandernden Zellen weitergeben. Hyperplasien dieser Art dürften wegen der kurzen Dauer der Stadien II a und II b nur passager auftreten.

Die intraazinär wachsende papilläre Hyperplasie

Bei einem Teil der Hyperplasien der Zymbaldrüse erfolgte eine Weiterentwicklung zum Faltenpapillom, das exophytisch nach intraazinär wuchs.

W. OEHLERT (1970) beschrieb den Mechanismus dieses Vorgangs Bei Vermehrung derjenigen Basalzellmitosen, deren Teilungsachse senkrecht zur Basalmembran steht, nimmt die Anzahl der Basalzellen und damit die Größe der Kontaktfläche des Epithels mit

dem subepithelialen Bindegewebe zu. Wird dabei ein bestimmtes Maß überschritten, so erfolgt Kompensation durch papillomatöse Auffaltung der Basalmembran zur Vergrößerung der Auflagefläche für Basalzellen.

Bei den enzymhistochemischen Nachweisen konnten die Zellen der intraazinär wachsenden papillären Hyperplasien den Stadien I - IV zugeordnet werden.

Zwischen den genannten Hyperplasieformen traten alle Übergänge auf. Stark entwickelte Hyperplasien führten zur Aufweitung der in der Nachbarschaft gelegenen Ductuli und wuchsen bisweilen auch in diese ein.

Hyperplasien Stadium III und IV

In einzelnen Fällen konnten Hyperplasien beobachtet werden, deren Zellen sowohl enzymhistochemisch als auch morphologisch eindeutig den Stadien III und IV zuzuordnen waren. Meist erreichten sie jedoch primär dieses Stadium nicht, da ihre Basalzellen in der Regel beim Übertritt ins Stadium IV verhornten und so intraazinär Nekrosen entstehen ließen.

Talgzellennekrose in der Hyperplasie und Zystenbildung

Ursache der Talgzellnekrosen war die metaplastische Umwandlung der Basalzellschicht bei Hyperplasien im Stadium IV. Die Differenzierung zu Talgzellen blieb aus. Auf den metaplastischen Zellen entstand eine Hornlamelle, welche möglicherweise die zentralen Talgzellen von der Versorgung, die durch Diffussion

von der Basalmembran aus erfolgt, abschnitt und so Nekrosen erzeugte. Zugleich mit der Nekrose bildeten sich im umgebenden Stroma akut entzündliche Infiltrate aus polymorphkernigen Leukozyten. Die Nekrosen wurden anschließend demarkiert und in den Ausführungsgang abgestoßen. Daraus entstanden Zysten.

Inwieweit das Zugrundegehen der Interzellularbrücken bei der neoplastischen Proliferation eine Rolle spielt, muß offen bleiben.

Die Zysten

Alle Zysten der oben beschriebenen Genese mußten also als Fortentwicklung von Hyperplasien des Stadium IV angesehen werden. Die Zysten hatten unterschiedliche Größe und wiesen in ihrer einfachsten Form eine glatte Wand aus ein- bis zweischichtigem, meist verhornendem Plattenepithel auf. Entstanden Zysten aus Hyperplasien mit zeitlich verzögerter Basalzelltransformation, so traten bisweilen Nekrosen nur in den Bereichen auf, deren Basalzellen bereits Stadium IV erreicht hatten. Zwischen die Teilnekrosen ragten dann Säulen von Talgzellen der Stadien I bis II b hinein. Auch hier bildete sich aber in der Endphase die glattwandige Zyste mit zweischichtigem, verhorntem Plattenepithel.

Die intraazinär wachsenden papillären Hyperplasien unterlagen ebenfalls der zystischen Umwandlung, wobei zunächst auch hier Teilnekrosen auftraten, die basal verhornende Metaplasien zeigten. Am Ende dieser Entwicklung stand die Zyste mit papillärer Auffaltung. Dabei bestanden die intrazystären papillären Basalzellproliferationen aus demselben ein- bis zweischichtigen Plattenepithel wie die Zystenwand.

d) Statistik

Von den 1375 registrierten praeneoplastischen Enzymdefektbezirken der direkten Karzinogenese gehörten 585 dem Stadium I an, 52 dem Stadium II a, 97 dem Stadium II b, 75 dem Stadium III und 565 dem Stadium IV.

TABELLE 5

Stadieneinteilung der direkten Karzinogenese

Enzymdefektbezirke	Stadium				
	I	II a	II b	III	IV
Anzahl	585	52	97	75	565

Im Verlauf der Untersuchungen traten die Ausfallsbezirke meist multipel auf. Es konnten in der Regel verschiedene Stadien nebeneinander bzw. in seltenen Fällen praeneoplastische und neoplastische Veränderungen an einer Drüse beobachtet werden.

I. F. HERRMANN (1974) führte in Zusammenarbeit mit Dipl. mat. R. REITER, Institut für medizinische Datenverarbeitung der GSF, die weitere statistische Auswertung der Ergebnisse durch.

Dabei wurde für die Klassifizierung von jeder Drüse nur der Bereich herangezogen, der das am weitesten fortgeschrittene Transformationsstadium aufwies. Die übrigen Enzymdefektbezirke der gleichen Drüse blieben unberücksichtigt. Es wurden zunächst Einheiten von 10 Tieren in der Reihenfolge der Aufarbeitung zusammengefaßt, dann Gruppen von je 3 bis 5 Einheiten gebildet, so daß eine Gruppe einem Zeitraum

von durchschnittlich 30 Tagen entsprach. Danach wurden die mittleren prozentualen Häufigkeiten der einzelnen Stadien in Abständen von etwa 10 Tagen errechnet. Daraus wurde die folgende graphische Darstellung gefertigt:

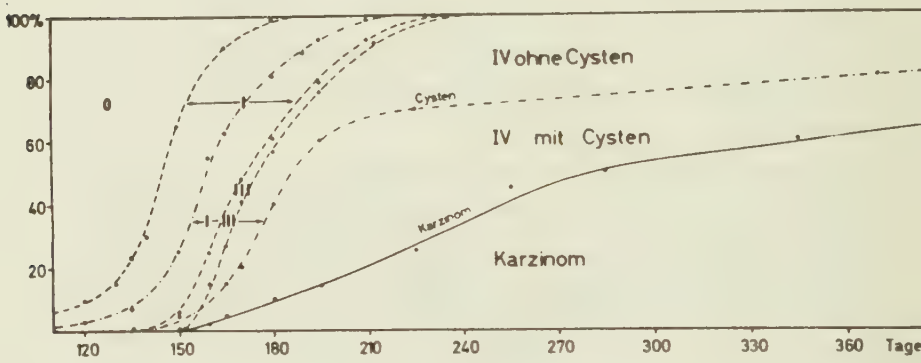


ABBILDUNG 1
Prozentuale Verteilung der Stadien der Karzinogenese in Abhängigkeit von der Zeit

Die Zysten mußten unabhängig von den Stadien betrachtet werden, da ein großer Teil von ihnen dem Stadium IV zuzuordnen war. Die Kurve für die Zysten gibt also unabhängig von den anderen Kurven die Zunahme der Häufigkeit der Zysten in der Zeit wieder.

Unter der Voraussetzung, daß von jeder Drüse nur das am weitesten fortgeschrittene Transformationsstadium berücksichtigt wurde, lassen sich folgende Aussagen machen:

Die Stadien I bis II treten ausschließlich zwischen dem 120. und 210. Tag nach Beginn der Kanzerisierung auf. Nach dem 210. Tag kann nur

noch das Stadium IV beobachtet werden.

Die statistische Auswertung sicherte das auf Grund der morphologischen und histochemischen Befunde aufgestellte Modell des stadienhaften Ablaufs der Zelltransformation und konnte zudem Aufschluß über die Dauer der einzelnen Stadien geben:

Das Stadium I konnte erstmals am 120. Tag nach Beginn der Kanzerisierung beobachtet werden. Eine außerordentliche Steigerung der Häufigkeit trat um den 135. Tag ein. Das Stadium I blieb durchschnittlich 20 Tage bestehen.

Betrachtet man die Zahl der Stadien I einschließlich derjenigen, die in einer Drüse mit bereits weiter fortgeschrittenen Transformationsstadien liegen, so ergibt sich ein Häufigkeitsgipfel etwa am 220. Tag, danach ein rasches Absinken bis zum 330. Tag, nach dem nur noch selten Stadien I zu beobachten waren.

Das Stadium II a ließ sich auf Grund der geringen Fallzahl statistisch nicht erfassen. Übergänge zum Vor- und Nachfolgestadium wurden häufig gefunden. Man kann vermuten, daß die Dauer dieses Stadiums nur einen Zellzyklus umfaßt. Die absolute Häufigkeit der Stadien II a stieg um den 190. Tag signifikant an.

Die Dauer des Stadiums II b beträgt nach der statistischen Auswertung 3 bis 4 Tage. Es tritt doppelt so häufig auf wie Stadium II a. Dies untermauert die Annahme von der kurzen Dauer des Stadiums II a.

Stadium IV blieb über mehrere Monate hinweg stationär. Die flach verlaufende Karzinomkurve läßt den Schluß zu, daß die Dauer dieses Stadiums starken Schwankungen unterliegt. Etwa ab dem 210. Tag zeigten alle Tiere ein Stadium IV (oder eine echte Neoplasie).

Zur statistischen Auswertung der praeneoplastischen Veränderungen der Hyperplasio-Karzinogenese wurden insgesamt 78 Hyperplasien erfaßt. Sie verteilten sich auf 6 vom Stadium 0 - I, 3 vom Stadium I - II a, 59 vom Stadium I - II b, 6 vom Stadium III und 4 vom Stadium IV.

TABELLE 6

Stadieneinteilung der Hyperplasio-Karzinogenese

Hyperplasien	Stadium				
	0 - I	I - II a	I - II b	III	IV
Anzahl	6	3	59	6	4

Eine Hyperplasie ohne neoplastische Zelltransformation wurde niemals gefunden. Die Hyperplasiogenese scheint an diesem Modell bei der gewählten Dosierung obligatorisch an die Karzinogenese gekoppelt zu sein.

Die ersten Hyperplasien traten um den 130. Tag nach Beginn der Kanzerisierung auf. Die Hyperplasien der Stadien I und II a ließen sich wegen der geringen Fallzahlen statistisch nicht erfassen. Diese Stadien scheinen von sehr kurzer Dauer zu sein. Die Häufigkeit der Hyperplasien vom Stadium I - II b nahm etwa 12 Tage nach dem Anstieg des Stadium I (der direkten Karzinogenese) stark zu. Man muß daher an-

nehmen, daß die Hyperplasiogenese gleichzeitig mit der Karzinogenese einsetzt oder daß sie während des Stadiums I beginnt.

Die Hyperplasien des Stadiums I - IIb wurden überwiegend zwischen dem 132. und 190. Versuchstag gefunden. Die statistischen Berechnungen weisen die Dauer dieses Stadiums der Hyperplasio-Karzinogenese mit 20 bis 23 Tagen aus.

Nur ein geringer Prozentsatz der Hyperplasien, nämlich diejenigen, deren basale Zellschicht nicht verhornt, ging durch das Stadium III in das Stadium IV über.

Die meisten Hyperplasien vom Typ des Stadium I - II b wandelten sich auf Grund der beschriebenen Basalzellmetaplasie mit Verhornung und nachfolgender suprabasaler Talgzellnekrose in Zysten um.

Zysten wurden erstmals am 160. Tag beobachtet. Ihre Häufigkeit stieg bis zum 200. Tag stark an.

Das Zystenstadium blieb ebenso wie das Stadium IV der direkten Karzinogenese über mehrere Monate stationär, bevor nach unterschiedlich langer Latenz die neoplastische Proliferation einsetzte.

210 Tage nach Beginn der Karzinogenapplikation hatten alle Tiere das Stadium IV oder das Karzinomstadium erreicht.

IV. DISKUSSION

a) DER HISTOCHEMISCHEN BEFUNDE

Am normalen Zymbaldrüsenepithel sowie am Epithel des Gehörganges von nicht kanzerisierten Ratten fehlt jegliche Aktivität von alkalischer Phosphatase. H. A. GOTTRON und W. SCHÖNFELD (1961) berichteten, daß auch in menschlicher Haut alle Epidermisschichten und die Talgdrüsen frei von aPh seien. H. W. SPIER und K. MARTIN (1956) hegten Zweifel an der Exaktheit dieser Befunde, da die aPh bei der Spaltung von energiereichem Phosphat eine wichtige Rolle spielt und die Haut über hohe Stoffwechselaktivitäten verfügt. Sie vermuteten eine Unzulänglichkeit des histochemischen Nachweises in der Form, daß kleinere Aktivitäten nicht nachweisbar seien.

In den vorliegenden Untersuchungen fand sich als früheste histochemisch faßbare Veränderung am morphologisch noch unauffälligen Epithel in scharf begrenzten Bezirken der Zymbaldrüse das Auftreten einer intensiven Reaktion der alkalischen Phosphatase.

Dies stimmt mit den Ergebnissen von I. F. HERRMANN (1974) und R. KÜRZL (1974) bei der Karzinogenese der Nasenschleimhaut der Ratte überein.

Nach Kanzerisierung von Wistar-Ratten mit 3,3'-Dichlor-4,4'-Diaminodiphenyläther bzw. trans-4-Dimethylaminostilben fand I. F. HERRMANN (1974) u. a. auch am Gehörgangsepithel in umschriebenen Epithelbezirken eine vorher nicht nachweisbare Aktivität der aPh zunächst ohne morphologische Veränderung der Zellen. Aus den enzympositiven Arealen entwickelten sich aPh-positive papilläre Hyperplasien, deren aPh-

Aktivität in späteren Transformationsstadien wieder verschwand, wobei vermehrt Atypien sowie die Entstehung von Tumoren aus diesen Veränderungen beobachtet wurden.

Vergleichbare Befunde erhob derselbe Autor (I. F. HERRMANN, 1974) an den Nasenschleimhäuten von BD-Ratten, die mit N-Nitrosopiperidin und 1,4-Dinitrosopiperazin kanzerisiert worden waren. HERRMANN sah auch hier als erste faßbare Alteration vor morphologischen Veränderungen in umschriebenen Bezirken der Schleimhäute eine hohe aPh-Aktivität. Diese Areale breiteten sich aus und ließen fokal Hyperplasien entstehen. Später entwickelten sich aus identischen Bezirken aPh-negative Plattenepithelmetaplasien.

Karzinogenabsetzversuche brachten in jener Arbeit genauso wie auch bei uns die Gewißheit, das Auftreten der alkalischen Phosphatase als toxischen Effekt ausschließen zu können. Es liegt daher der Schluß nahe, daß das Erscheinen der alkalischen Phosphatase ebenso wie der beschriebene Ausfall verschiedener anderer Enzyme durch eine irreversible, genetisch fixierte Schädigung der Zelle verursacht wird.

T. MATSUMURA (1966) implantierte in die Speicheldrüsen von Mäusen mit 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthrazen imprägnierte Pellets. Neben morphologischen Veränderungen beschreibt er als Ergebnis der histochemischen Untersuchungen in Übereinstimmung mit unseren Befunden eine initial auftretende intensive Aktivität der alkalischen Phosphatase im Bereich "degenerierender myoepithelialer Zellen", die später in einer Phase der Erweiterung der Ductus und der Metaplasie der Epithelien wieder verschwindet. Er führt diesen Befund auf den chirurgischen Eingriff bei der Implantation zurück.

Untersuchungen von I. F. HERRMANN (1974) zur Epithelregeneration am

Gehörgang der Ratte ergaben jedoch, daß im Epithel durch chirurgische Maßnahmen alkalische Phosphatase nicht zu induzieren ist.

Bei Durchsicht der einschlägigen Literatur fällt auf, daß mit verschiedenen Karzinogenen an funktionell unterschiedlichen Epithelien der Ratte gleiche Enzymaktivitäten oder Ausfälle induziert werden können: Z. B. an der Nasenschleimhaut (I. F. HERMANN und A. SCHAUER, 1972; R. KÜRZL, 1974), am Gehörgang und der Zymbaldrüse (I. F. HERRMANN, 1974).

Wie in der vorliegenden Untersuchung gezeigt wurde, können die Veränderungen der Enzymaktivitäten jeweils bestimmten Stadien in einem schematisch ablaufenden praeneoplastischen Abschnitt der Karzinogenese zugeordnet werden, wobei in den späteren Phasen morphologische Befunde mit den histochemischen korrelieren. Die histochemischen Veränderungen zeigen dabei als erste die in Gang befindliche Transformation der Zellen an.

Man kann annehmen, daß der Ausfall bestimmter Enzyme, z. B. der Cytochromoxidase, die Zellnekrose herbeiführen müßte. Dies tritt nach den gemachten Beobachtungen nicht ein. Das kann zweierlei Ursachen haben:

Die Enzymaktivität kann so stark vermindert sein, daß sie mit den ungenauen histochemischen Methoden zwar nicht mehr nachweisbar ist, zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels aber noch ausreicht.

Trifft das nicht zu, so muß angenommen werden, daß die Zelle fähig ist, ihren Stoffwechsel durch Beschreiten von Stoffwechselnebenwegen aufrecht zu erhalten. Dabei dürften Enzyme neu induziert (Substratinduktion) oder Enzymaktivitäten gesteigert werden.

In dieser Blickrichtung könnte eine Erklärung z. B. für die Erhöhung der Aktivitäten von SDH und ATPase in Stadium IV gefunden werden. So bietet sich als Ursache der ATPase-Steigerung der Ausfall der alkalischen Phosphatase im selben Stadium IV an, da beide eine ähnliche Stoffwechselfunktion ausüben. Auch eine Wechselbeziehung zwischen alkalischer Phosphatase und Glykogen, das nach dem Ausfall der aPh selbst wieder verschwindet, wäre denkbar.

E. KUNZE und A. SCHAUER (1971) kanzerisierten weibliche Wistar-Ratten mit Dibutylnitrosamin, um die Karzinogenese am Harnblasenepithel zu studieren. Sie beobachteten in praeneoplastischen Enzymdefektbezirken zunächst ohne Hyperplasieentwicklung neben einem Ausfall der alkalischen Phosphatase (die dort normalerweise in hoher Aktivität vorhanden ist), eine starke Aktivitätsabschwächung der NADH-Diaphorase sowie eine erhebliche Aktivitätszunahme der Succinatdehydrogenase. Die Autoren weisen auf die enge Beziehung zwischen aPh und den Nucleosid-5'-Triphosphatasen und ihre Bedeutung im Nucleosidstoffwechsel hin. Sie vermuten, daß nach Ausfall des NADH-Diaphorase-Systems die Wasserstoffübertragung vom Zitronensäure-Zyklus in die Atmungskette einen Nebenweg über die FAD-abhängige SDH einschlägt und führen so deren Aktivitätserhöhung auf Substratinduktion zurück.

P. BANNASCH (1971) stellt die im Verlauf der Hepatokarzinogenese auftretende Glykogenspeicherung als irreversiblen, toxischen Defekt glykogenolytischer Enzyme dar. Er hält die Glykogenose der Hepatozyten für ein erstes Stadium der Karzinogenese, an das sich als zweite Phase nach einer gewissen Latenz die Transformation der Glykogenspeicherzellen in glykogenfreie Hepatomzellen anschließt.

Dagegen trat bei unserem Modell die Glykogenose erst in einem sehr späten Stadium auf.

b) DISKUSSION DER MORPHOLOGISCHEN BEFUNDE

Es wurden zwei Formen der malignen Zelltransformation gefunden, bei denen jeweils typische morphologische Zellalterationen zu beobachten waren.

Über Befunde, die den von uns während der direkten Karzinogenese erhobenen gleichen, berichten verschiedene Autoren. A. SCHAUER und E. KUNZE (1968) induzierten mit Diäthylnitrosamin in der Rattenleber "basophile Herde", die morphologisch mit den hier vorgelegten Enzymausfallsbezirken der Stadien II b bis IV übereinstimmen dürften.

Auch H. N. TAWFIC (1965), der 4-DAS in einer täglichen Dosis von 0,8 mg über 5 Monate hinweg (Gesamtdosis 120 mg) an Donryu-Ratten verabreichte, beobachtete an der Zymbaldrüse hyperplastische Lobuli mit kleinen Zellen, basophilem Zytoplasma und großen Kernen.

Auch in unserer Untersuchung erwiesen sich diese basophilen Herde als die ersten morphologisch faßbaren praeneoplastischen Veränderungen.

J. O. LAWS et al. (1955) kamen zu denselben Ergebnissen. Sie verabreichten an männliche Wistar-Ratten 2-Acetylaminofluoren und sahen als histologisch erste Alterationen scharfbegrenzte Lobuli, deren Zellen basophiles Zytoplasma aufwiesen und deren Kerne hyperchromatisch erschienen.

Auch zu den Befunden der Hyperplasio-Karzinogenese liegt eine Anzahl vergleichbarer Arbeiten vor.

S. C. SKORYNA und Mitarb. (1951) untersuchten u. a. Neoplasien der

Zymbaldrüse der Ratte und deren Entwicklung nach Kanzerisierung mit 2-Acetylaminofluoren. Sie sind der Meinung, daß das Tumorwachstum seinen Ausgang vom Epithel zystisch veränderter Lobi nehme, die Horn oder Talgmassen beinhalten. SKORYNA glaubt, daß diese Veränderungen auch ohne Kanzerisierung auftreten, dann aber nicht zur neoplastischen Proliferation führen. Tumoren sollen sich nur auf dem Boden dieser Veränderungen entwickeln können. Die zystische Umwandlung und der damit verbundene Sekretionsstop üben nach seiner Ansicht einen "lokalisierenden Effekt" auf die karzinogene Wirksamkeit der Substanz aus.

Tatsächlich entwickelten sich auch in unserer Untersuchung Neoplasien meist aus den metaplastischen Zysten ohne Talgzelldifferenzierung, deren Wände sich aus Zellen des Stadium IV zusammensetzten. Daneben entstanden Tumoren auch in der direkten Karzinogenese aus den Stadien IV ohne Umweg über Hyperplasie bzw. Zyste.

Als Ursache der Zystenbildung aus Hyperplasien erscheinen drei verschiedene Mechanismen möglich:

1. Bei der Metaplasie der Basalzellen der hyperplastischen Azini entsteht eine Hornlamelle, welche die zentral gelegenen Zellen von der Versorgung durch Diffusion abschneidet, worauf diese nekrotisch werden und Zysten entstehen.
2. Die Hyperplasie der Azini bewirkt allein durch Verlängerung der Diffusionswege eine Nekrose der zentralen Zellen.
3. Im Rahmen der Hyperplasieentwicklung wird die Diffusion durch Auflösung der Interzellularbrücken unmöglich gemacht.

Auch ein Zusammenwirken aller drei Faktoren wäre denkbar. Neben den zystischen Veränderungen erwähnt SKORYNA auch ein papilläres

Wachstum innerhalb der alterierten Drüsenläppchen, ein Befund, der mit der intraazinär wachsenden, papillären Hyperplasie der Hyperplasio-Karzinogenese identisch sein dürfte. Weiter postuliert er einen Zusammenhang der Bildung von Neoplasien mit einer latenten Mittelohrentzündung der Tiere.

T. MATSUMURA (1966) beobachtete an kanzerisierten Speicheldrüsen von Mäusen als erste Alterationen im Rahmen der Karzinogenese zystenartige Erweiterungen der Ausführungsgänge und verhornende Plattenepithelmetaplasien der proliferierenden Ductus-Epithelien.

J. O. LAWS et al. (1955) geben an, daß Ductus-Erweiterungen ebenso häufig bei Tumor-freien wie bei tumorösen Zymbaldrüsen auftraten und daß sie einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Neoplasien und dem Vorhandensein von Otitiden oder Zysten nicht feststellen konnten. Anders als wir mißt LAWS der Hyperplasie bei der Entstehung von Tumoren an der Zymbaldrüse keine Bedeutung bei. Seine Ansicht, daß die Transformation alle Zellen eines Bezirks oder Läppchens gleichzeitig oder nahezu gleichzeitig erfaßt und nicht etwa eine einzelne Zelle mutiert und proliferiert, wird durch unsere Beobachtungen bestätigt.

J. L. SCHARDEIN und D. H. KAUMP (1966) gaben als erste Veränderungen der Zymbaldrüse adenomatöse Knoten an, die innerhalb von zystisch erweiterten Drüsenausführungsgängen gelegen waren. Dieser Befund entspricht der oben beschriebenen intraazinär wachsenden, papillären Hyperplasie (der Hyperplasio-Karzinogenese), die bisweilen mit einer Erweiterung der Ausführungsgänge einherging. SCHARDEIN glaubt, eine zystische Dilatation der Lobuli vermehrt bei älteren Ratten beobachtet zu haben und wertet dies als praedisponierenden Faktor der Tumorbildung.

Demgegenüber berichtet I. F. HERRMANN (1974) davon, daß bei nicht kanzerisierten Kontrolltieren nach mehr als 400 Tagen nur selten Zysten in der Zymbaldrüse auftreten, daß die kanzerisierten Tiere aber nach dem 180. Tag in der Regel Zystenbildung zeigen.

Auch SCHARDEIN und KAUMP sahen keinen Zusammenhang zwischen latenter otitis media und Karzinomentstehung.

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, daß in der praeneoplastischen Phase einer chemisch induzierten Karzinogenese vor dem Auftreten morphologischer Alterationen enzymhistochemische Frühveränderungen zu erfassen sind, bleibt zu hoffen, auch am menschlichen Gewebe maligne Entartung durch histochemische Nachweise einer Frühdiagnose zuführen zu können.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Frühveränderungen der chemisch induzierten Karzinogenese an der Zymbaldrüse der Ratte untersucht. Dabei konnten zwei Formen der Zelltransformation unterschieden werden:

1. Die direkte Karzinogenese und
2. die Hyperplasio-Karzinogenese, bei der die Zelltransformation mit der Entwicklung einer Hyperplasie einhergeht.

1. Die direkte Karzinogenese verlief konstant stadienhaft: In einem Stadium I trat am morphologisch unveränderten Talgdrüsenepithel in umschriebenen Bezirken eine starke, zuvor nicht nachweisbare Aktivität der alkalischen Phosphatase auf.

In einem Stadium II a verringerten sich in identischen Bezirken die Aktivitäten der 5-Bromindoxylacetatesterase, Cytochromoxidase, α-Naphthylacetatesterase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase stark.

Der Ausfall der Laktatdehydrogenase und NADH-Diaphorase charakterisierte das Stadium II b.

Es zeigten sich hier erstmals morphologische Veränderungen: Im Vergleich zur normalen Drüse dicht gelagerte, hyperchromatische Zellkerne, optisch leeres Zytoplasma, zugunsten des Kerns verschobene Kern-Plasma-Relation.

Im nachfolgenden Stadium III trat - histochemisch nachweisbar - eine Glykogenose der Zellen auf. Im Verlauf dieses Stadiums fiel die

alkalische Phosphatase aus, an seinem Ende verschwand auch das Glykogen.

Der Aktivitätsausfall der alkalischen Phosphatase kennzeichnete den Beginn von Stadium IV, während dessen Dauer die Glykogenose von Stadium III wieder verschwand. Die Stadien III und IV überschnitten sich also. Die Aktivitäten der Adenosintriphosphatase und Succinatdehydrogenase stiegen in Stadium IV an.

Morphologische Befunde: Schmale basophile Zytoplasmasäume um dicht gelagerte, kleine, hyperchromatische Kerne.

Dazu kann festgestellt werden:

All diese Alterationen traten auch noch 300 Tage nach dem Absetzen des Karzinogens auf. Eine toxisch-entzündliche Genese scheidet daher aus.

Die Zuverlässigkeit des erarbeiteten Schemas erschien zweifach gesichert:

1. Zu den Stadien konnten regelmäßig Übergänge zum Vor- und Nachfolgestadium beobachtet werden.
2. Die einzelnen Stadien traten im Verlauf der Untersuchungen in zeitlicher Folge auf.

An das letzte Stadium konnte sich dann die neoplastische Proliferation mit infiltrierendem Wachstum anschließen, jedoch setzte auch aus früheren Stadien heraus das Tumorwachstum ein.

2. Die Hyperplasio-Karzinogenese zeigte grundsätzlich denselben stadienhaften Ablauf. Hyperplasien ohne histochemisch nachweisbare Transformation traten dabei niemals auf. Das heißt, die

Hyperplasien entwickelten sich zu Beginn oder während des Stadiums I.

Beim Eintritt der hyperplastischen Azini ins Stadium IV erfolgte in der Regel die Nekrose der suprabasal gelegenen Talgzellen. Es bildeten sich Zysten mit einer Wand aus zweischichtigem verhorntem Plattenepithel.

Im Rahmen der Hyperplasio-Karzinogenese entstanden Karzinome aus den Hyperplasien vom Stadium IV sowie aus den transformierten Basalzellen bzw. den Plattenepithelien der Zystenwände. Auch aus früheren Stadien der Hyperplasio-Karzinogenese gingen Tumoren hervor.

In der Diskussion werden die vorgelegten Befunde mit den Ergebnissen anderer Autoren verglichen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

BANNASCH, P. und H. z. HAUSEN:
Zelluläre und molekulare Aspekte der Krebsentstehung
Therapeutische Berichte 1/71, Hrsg. Bayer Leverkusen 43. Jhrg., 1971

BEST, F.: Über Karminfärbung des Glykogens und der Kerne
Zschr. wiss. Mikrosk. 23, 319 (1906)

BRAUN-FALCO, O.:
Die Histochemie der Haut
Aus H. A. Gottron und W. Schönfeld (Hrsg.),
Dermatologie und Venerologie Bd. I/1,
Thieme-Verlag, Stuttgart 1961

DRUCKREY, H., D. SCHMÄHL, W. DISCHLER und A. SCHILDBACH:
Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung
Naturwissensch. 49, 217-228 (1962)

GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode
Histochemie 1, 48-96 (1958)

GOTTRON, H. A. und W. SCHÖNFELD (Hrsg.):
Dermatologie und Venerologie, Bd. I
Thieme-Verlag, Stuttgart 1961

GRZYCKI, S., et G. RZESZOWSKA:
Activité de la déhydrogénase de l'acide lactique (LDH) et de la déhydrogénase glucose-6-phosphatate (G-6-PD) dans l'épithélium de la vésicule biliaire de la grenouille (Rana esculenta)
Z. mikr.-anat. Forsch. 76, 546 (1967)

HERRMANN I. F.: Frühveränderungen der Karzinogenese im oberen Respirationstrakt und am äußeren Gehörgang mit seinen Anhangsgebilden.
Tierexperimentelle Untersuchungen 1974

HERRMANN, I. F. und A. SCHAUER:
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Kanzerogenese der Nasenschleimhaut
Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk.-Heilk. 202, 385-389 (1972)

HERRMANN, I. F. and A. SCHAUER:
Histochemical and Autoradiographic Studies on Cell Transformation Induced by trans-4-Dimethylaminostilbene in the Ceruminal Gland of Rats
2. Europäischer Krebskongreß, Heidelberg 1973

HOLT, S. H. and R. F. J. WITHERS:
Cytochemical Localization of Esterase Using Indoxyl-Derivates
Nature 170, 1012 (1952)

KAMKE, W.: Morphologische, histochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Kanzerisierung des Gehörgangs der Ratte durch 3,3'-Dichlor-4,4'-diaminodiphenyläther sowie trans-4-Dimethylaminostilben
Dissertation, München 1974

KÜRZL, R.: Morphologische, enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen zur Kanzerogenese an der Nasenschleimhaut, induziert durch 1,4-Dinitrosopiperazin
Dissertation, München 1974

KUNZE E. und A. SCHAUER:
Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen an Dibutylnitrosamin-induzierten Harnblasenpapillomen der Ratte
Z. Krebsforsch. 80, 189-196 (1973)

LAWS, J. O., G. RUDALLI, R. ROGER and P. MABILLE:
The early changes produced in the auditory sebaceous gland (Zymbal's gland) of the rat by 2-acetylaminofluorene
Cancer Res. 15, 139 (1955)

MATSUMURA, T.: Enzyme Histochemistry of Experimentally Induced Tumors in the Mouse Submaxillary and Sublingual Glands During Carcinogenesis
Gann 57, 251-263 (1966)

METZLER, M. und H. G. NEUMANN:
Zur Bedeutung chemisch-biologischer Wechselwirkungen für die toxische und krebserzeugende Wirkung aromatischer Amine.
IV. Stoffwechselmuster von trans-4-Dimethylaminostilben, cis-4-Dimethylaminostilben und 4-Dimethylaminobibenzyl in Leber, Niere und den Ausscheidungsprodukten der Ratte
Z. Krebsforsch. 76, 16-39 (1971)

MILLER, J. A. and E. C. MILLER:
The Metabolic Activation of Cancerogenic Aromatic Amines and Amides
Progr. exp. Tumor Res. 11, 273-301 (1969)

NACHLAS, M. M., D. T. CRAWFORD, T. P. GOLDSTEIN and A. M. SELIGMAN:
The Histochemical Demonstration of Cytochromic Oxidase with a New Reagent from the Nadi Reaction
J. Histochem. Cytochem. 6, 445 (1958)

NEUKIRCH, P.:
Über eine neue Methode der Glykogenfixation
Zb. Path. 20, 531-533 (1909)

NEUMANN, H. G., M. METZLER, I. BACHMANN und C. THOMAS:
Zur Bedeutung chemisch-biologischer Wechselwirkungen für die toxische und krebserzeugende Wirkung aromatischer Amine.
I. Krebserzeugende Wirksamkeit einiger 4-Aminostilben- und 4-Aminobibenzyl-Verbindungen.
Z. Krebsforsch. 74, 200-206 (1970)

OEHLERT, W.:
Regeneration, Hyperplasie und Cancerisierung am Beispiel der epithelialen Wechselgewebe
Aus: Handbuch der Allgemeinen Pathologie. Entwicklung und Wachstum II.
Berlin, Heidelberg, New York. Springer 1969

RATH, F. W. und L. OTTO:
Zur histochemischen Darstellung der ß-Glucuronidase
Acta histochemica 25, 355-426 (1966)

RJOSK, H. K. und H. G. NEUMANN:
Zur Bedeutung chemisch-biologischer Wechselwirkungen für die toxische und krebserzeugende Wirkung aromatischer Amine
II. Verteilung der Radioaktivität nach Applikation des Tritium-markierten Carcinogens trans-4-Dimethylaminostilben und 4-Dimethylaminobibenzyl in der Ratte
Z. Krebsforsch. 75, 209-220 (1971)

ROSA, C. G. and K. C. TSOU:
Use of Tetrazolium Compounds in Oxidative Enzyme-Histo- and Cytochemistry
Nature 192, 990 (1961)

RUDOLPH, G. und H. J. KLEIN:
Histochemische Darstellung und Verteilung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in normalen Rattenorganen
Histochemie 4, 238-251 (1964)

SCARPELLI, D. G., R. HESS and A. G. E. PEARSE:
The Cytochemical Localization of Oxidative Enzymes. I. Diphosphopyridine Nucleotide Diaphorase and Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorase
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 747 (1958)

SCHARDEIN, J. L. and D. H. KAUMP:
Auditory Canal Structures in Rats as Altered by Aging and by Administration of Tris (p-aminophenyl)-carbonium-pamoate
Cancer Res. 26, 1625-1632 (1966)

SCHAUER, A. und E. KUNZE:
Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin
Z. Krebsforsch. 70, 252-266 (1968)

SKORYNA, S. C., C. R. RODERICK and L. A. RUDIS:
Histogenesis of Sebaceous Gland Carcinomas Produced in Rats by 2-Acetylaminofluorene
J. exp. Medicine 94, 1-8 (1951)

SPIER, H. W. und K. MARTIN:
Histochemische Untersuchungen über die Phosphomonoesterasen der gesunden Haut mit Hinweis auf Befunde bei Hauterkrankungen
Arch. klin. exp. Dermat. 202, 120 (1956)

STUTTE, H. J.: Hexazotiertes Triamino-Tritolyl-Methanchlorid (Neufuchsin) als Kupplungssalz in der Fermenthistochemie
Histochemi 8, 327 (1967)

TAWFIC, H. N.: Studies on Ear Duct Tumors in Rats.
Part I: Incidence and Pathogenesis of 4-Dimethylaminostilbene-Induced Tumors in Donryu-Rats
Acta path. jap. 15, 247-253 (1965)

WACHSTEIN, M. and E. MEISEL:
Histochemistry of Hepatic Phosphatases of a Physiologic pH
Am. J. Clin. Path. 27, 13 (1957)

ZAWISCH-OSSENITZ, C.:
Das Talgdrüsenorgan des Gehörgangs von Nagern und Insektivoren
Z. f. mikr.-anat. Forsch. 33, 625 (1933)

ZYMBAL, W. E.: Histologische und experimentelle Untersuchungen am Epithelgewebe der Talgdrüsen (Gehörgangsdrüse der Ratte)
Z. f. Zellforsch. u. mikr. Anat. 18, 596-625 (1933)

LEBENSLAUF

Am 25. Januar 1949 wurde ich, Fritz Karl Werner, als zweiter Sohn des Finanzbeamten Karl Werner und seiner Ehefrau, der Lehrerin Anna Werner, geb. Wickl, in Bayreuth geboren.

1950 wurde mein Vater nach Bad Kissingen versetzt. Hier besuchte ich die Volksschule, anschließend das Neusprachliche Gymnasium. Das Abitur legte ich im Juli 1968 ab.

Vom Wintersemester 1968/69 an studierte ich an der Universität München Chemie und wechselte ein Jahr später zum Fach Zahnmedizin über.

Ich bestand die zahnärztliche Vorprüfung im April 1972 und absolvierte das Staatsexamen am 13. Februar 1975 mit der Gesamtnote sehr gut.

Von Juli 1975 bis September 1976 leistete ich meinen Wehrdienst als Stabsarzt der Bundeswehr in Oldenburg ab.

Anschließend war ich als Assistent in einer zahnärztlichen Praxis in Cloppenburg tätig.

Im April 1978 ließ ich mich in eigener Praxis in Oldenburg nieder.

Fritz Werner